

UNIVERSITÉ DE GENÈVE

Laboratoire de chimie organique et pharmaceutique

FACULTÉ DES SCIENCES

Prof. E. CHERBULIEZ

Etude de polypeptides neutres issus de la caséine et possédant une activité strépogénique

THÈSE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de Docteur en pharmacie

par

Jean GONIN

de Genève

Thèse N° 1290

GENÈVE
ÉDITIONS MÉDECINE ET HYGIÈNE
1958



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552321_0033

UNIVERSITÉ DE GENÈVE

Laboratoire de chimie organique et pharmaceutique

FACULTÉ DES SCIENCES

Prof. E. CHERBULIEZ

Etude de polypeptides neutres issus de la caséine et possédant une activité strépogénique

THÈSE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de Docteur en pharmacie

par

Jean GONIN

de Genève

Thèse N° 1290



GENÈVE

ÉDITIONS MÉDECINE ET HYGIÈNE

1958

*La faculté des sciences, sur le préavis de Monsieur le professeur
E. Cherbuliez, autorise l'impression de la présente thèse, sans
exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.*

Genève, le 12 juillet 1958.

Le doyen :

Fernand CHODAT

Thèse N° 1290

J'exprime mes plus vifs remerciements et toute ma reconnaissance à Monsieur le Professeur E. Cherbuliez pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail.

Je remercie très sincèrement Monsieur Baudet pour les précieux conseils et les encouragements qu'il m'a donné au cours de ce travail.

A MA FEMME

GENERALITES

C'est en 1941 que Woolley (1) montra, dans des extraits aqueux de foie, la présence d'un nouveau facteur de croissance pour certains streptocoques hémolytiques du groupe A de Lancefield. Grossowics (2) put confirmer l'existence de cette substance.

En 1944 Sprince et Woolley (3) nommèrent ce facteur "strépogénine" et é mirent l'hypothèse qu'il devait être identique à d'autres facteurs de croissance, nécessaires pour le *Lactobacillus casei* (4) et le *Streptococcus lactis* (5). La même année Wright et Skeggs (6) montrèrent que des hydrolysats enzymatiques de caséine étaient des sources riches en ce facteur. Sprince et Woolley (7,8) trouvèrent également ce facteur dans les hydrolysats enzymatiques de plusieurs autres protéines (trypsine, ribonucléase, chymotrypsine, insuline, par ex.) et constatèrent que l'insuline en était la source la plus riche. Ils introduisirent l'emploi du *Lactobacillus casei* pour le dosage bactériologique de la strépogénine.

Sprince et Woolley (7,8) prouvèrent que ce facteur est de nature polypeptidique. Woolley et al. (9,10) mirent en évidence l'activité strépogénique de l'oxytocine et des peptides parents de l'oxytocine. Récemment Woolley et Merrifield (11), Tritsch et Woolley (12) isolèrent d'un hydrolysat acide d'insuline de boeuf cristallisée un penta-, un hepta- et un hexapeptide à activité strépogénique (86, 98 et 200 unités resp.). Ils établirent leurs séquences respectives: pentapeptide: Ser.his.leu.val.glu; heptapeptide: Ser.his.leu.val.glu.ala.leu; hexapeptide: Leu.val.cys.gly.glu.arg. Ces auteurs ont rapporté ainsi la preuve de l'existence d'une multiplicité de strépogénines.

Etudiant les produits d'hydrolyse partielle de la caséine, Cherbuliez, Baudet et Rössler (13,14) ont constaté qu'après séparation de ces produits par électrodialyse en 3 fractions, neutre, acide et basique, seules les fractions basique et neutre présentaient une activité strépogénique. Examinant plus particulièrement la fraction basique ils en ont isolé 2 strépogénines dont ils ont déterminé la séquence; ils trouvèrent un undécapeptide : valyl-glutaminy-valyl-leucyl-prolyl-prolyl-prolyl-valyl-prolyl-glutaminy-lysine. et un dodecapeptide : alanyl-glutaminy-prolyl-prolyl-valyl-tyrosyl-alanyl-prolyl-prolyl-valyl-glutaminy-arginine. Pour un 3ème peptide actif (encore un dodécapeptide), ils ont établi seulement la nature des restes d'acides aminés présents.

RECHERCHES PERSONNELLES

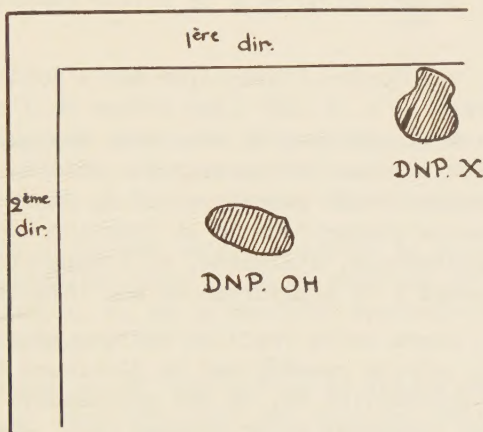
Nous nous sommes proposé d'étudier les strépogénines de la fraction neutre. D'un hydrolysats trypsique de caséine nous avons isolé 3 polypeptides neutres que nous désignons respectivement par lpp, 2pA et 2pB. Leur poids moléculaire est nettement supérieur à celui des strépogénines connues, et ils sont caractérisés notamment par l'altérabilité de leur activité strépogéniques. Ils diffèrent de ceux isolés par Woolley et Merrifield, Tritsch et Woolley, ainsi que de ceux de Cherbuliez, Baudet et Rössler. Il ne nous a pas été possible d'établir la structure de ces polypeptides par suite, d'une part de leur poids moléculaire élevé, et d'autre part par leur labilité à pH 6,5 et aux pH supérieurs.

Leur particularité la plus frappante est leur teneur très élevée en résidus d'acides aminés dicarboxyliques. Ainsi le peptide 1 pp compte 8 restes glutamiques et 4 restes aspartiques, dont 11 sont sous forme d'amide, sur un total de 27 acides aminés. Le peptide 2 pA compte au moins 8 restes glutamiques et 3-4 restes aspartiques, dont 3 environ sont sous forme d'amide, sur un total de 29 acides aminés.

Lors de l'électrophorèse à pH 2, le peptide 1 pp migre comme les acides aminés neutres. Le dosage des fonctions amides confirme ce comportement, puisque un seul carboxyle d'acide aminé dicarboxylique est libre et compense ainsi la basicité due à l'unique reste d'amino-acide basique présent: la lysine. Nous

avons l'intention d'utiliser la méthode de la carboxypeptidase A afin de contrôler le résultat donné par l'hydrazinolyse d'après lequel la lysine constitue l'acide aminé C-terminal. En effet la carboxypeptidase A libère très lentement, mais quantitativement, la lysine lorsque le rapport enzyme/substrat est suffisamment grand. Malheureusement nous n'avons pas pu utiliser cette méthode. D'une part nous observons à pH 6.5 et aux pH supérieurs une transformation du peptide en peptides acides, neutres et basiques (v. partie expérimentale). Nous n'avons pas étudié cette transformation, car l'élution de ces différents peptides après ionophorèse à haut potentiel n'est pas possible, la presque totalité restant fixée sur le papier. D'autre part l'enzyme n'a libéré aucun acide aminé. Il nous semble que cette altérabilité chimique doit être rapprochée de l'instabilité du pouvoir strépogénique de ce peptide.

Lors de la détermination de l'acide aminé N-terminal du peptide 2 pA par dinitrophénylation suivie d'hydrolyse acide, nous avons constaté, après chromatographie bidimensionnelle selon Koch et Weidel (15), que le dérivé dinitrophénylé obtenu occupait une position ne correspondant pas à aucun acide aminé dinitrophénylé connu (v. Fig.),



La substance de cette tache est éluée du chromatogramme, puis régénérée à partir de son dérivé dinitrophénylé par hydrolyse barytique, selon Mills (16). Il est à noter qu'au cours de cette opération cette substance se montre stable, alors qu'elle est dégradée par la soude caustique 1,5 N et fournit alors des acides aminés. Il est probable que ce fait est dû aux concentrations différentes mises en oeuvre : nous utilisons de l'eau de baryte 0,35 N, alors que la soude caustique est 1,5 N, soit d'une normalité 4 x plus élevée.

La substance provenant de cette régénération est soumise à une ionophorèse à pH 2, à haut potentiel (1500 V., 20 mA, 2 h.). Nous constatons la présence d'une tache basique, réagissant à la ninhydrine, et possédant la même vitesse de migration que la lysine. D'autre part cette substance est soumise à une chromatographie dans le solvant phénol/*m*-crésol/tampon borate pH 9,3 (17), en présence de lysine, d'hydroxylysine, et d'arginine. Nous obtenons une tache dont le R_f est 0,03 et qui ne correspond pas aux acides aminés témoins.

Divers auteurs (18,19) ont signalé la présence d'une substance basique, réagissant à la ninhydrine, dans un extrait de *Corynebacterium Diphtheriae*, soumis à l'hydrolyse acide classique. Ils ont supposé qu'il devait s'agir d'un peptide difficilement hydrolysable. Dès lors nous avons orienté nos recherches dans ce sens.

Nous avons soumis le peptide 2 p à l'hydrolyse chlorhydrique classique (5,7 N, 105°, 18 h.). Nous séparons par ionophorèse à pH 2, à haut potentiel, la fraction basique de ce peptide. Celle-ci est traitée à nouveau par l'acide chlorhydrique 5,7 N, à 105°, durant 18 h. Elle se révèle résistante à cette hydrolyse.

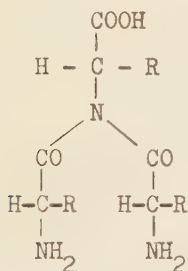
Par contre l'hydrolyse par l'acide chlorhydrique concentré, durant 48 h. à 160° (18), libère de l'acide glutamique, de l'alanine, de la glycine, et une tache basique, pouvant être soit la fraction basique non hydrolysée, soit de la lysine. Après hydrolyse alcaline (soude caustique 1,5 N, durant 2 h. 50, à 90°) nous constatons la disparition de la fraction basique, la libération d'acide glutamique, d'alanine, et l'apparition de 2 taches acides, réagissant à la ninhydrine et non identifiées.

Comme cette fraction basique réagit à la ninhydrine, il est évident qu'elle possède une ou plusieurs fonctions aminées libres. Après destruction du, ou des groupements aminés libres, par les vapeurs nitreuses selon Consden (20), une réaction de chloration des fonctions amide et amine selon Reindell (21) est effectuée. Elle est négative. La réaction à la ninhydrine devient négative. Il semblerait donc que cette fraction basique ne posséderait pas de liaisons peptidiques normales -CO-NH-R.

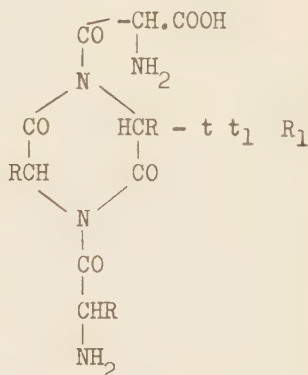
Le spectre UV du dérivé dinitrophénylé de cette fraction basique est tout à fait semblable à ceux des acides aminés dinitrophénylés, ce qui exclut la présence d'un groupement méthylène ou thiol, dinitrophénylé.

Le spectre d'absorption infra-rouge de cette fraction, dinitrophénylée, examinée à l'état solide, montre une bande à 1725 cm^{-1} . Dans la région de la bande amide normale, se trouvant entre $1570\text{--}1515\text{ cm}^{-1}$ et 1558 cm^{-1} pour le peptide 1 pp utilisé comme témoin, on ne trouve qu'une fréquence à 1725 cm^{-1} qui pourrait correspondre au type d'amide -CO-N-CO- absorbant, selon Edsall (22), entre 1790 et 1720 cm^{-1} .

Nous pourrions alors proposer l'hypothèse de structure suivante:



ou



dans laquelle la fonction carboxyle d'un acide aminé serait engagée sur l'atome d'azote d'un groupement classique peptidique, par une liaison amide créant un atome d'azote trisubstitué.

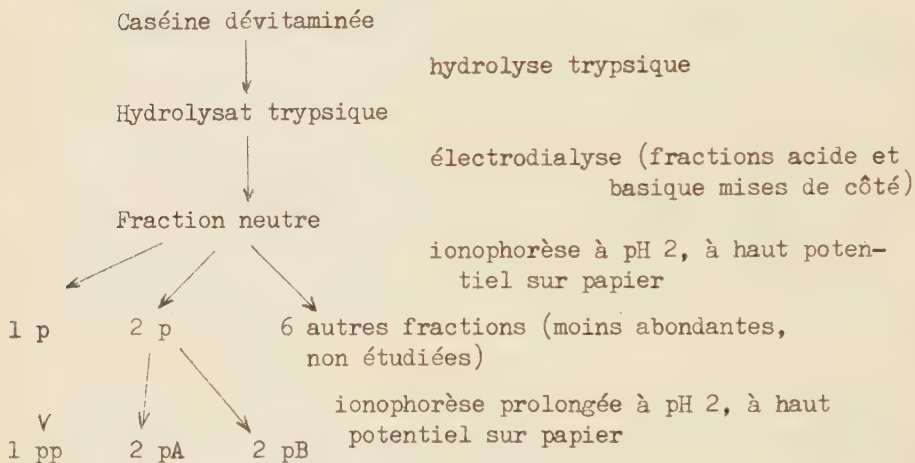
Cette structure rendrait compte de la forte basicité de la fraction, du résultat négatif de la réaction de chloramination, après désamination, et de la position anormale de la bande amide dans l'infra rouge.

L'examen de la composition en acides aminés de nos 3 peptides neutres et des structures des peptides établies par Woolley et al. d'une part, et par Cherbuliez, Baudet et Rössler d'autre part, ne permet pas de dégager un facteur structurel commun à toutes ces strépegénines. Cependant nous remarquons que les peptides courts, isolés par Woolley et al., présentent une activité strépegénique beaucoup plus forte (hexapeptide: 200 unités) que ceux isolés par Cherbuliez, Baudet et Rössler (dodécapeptide: 80 unités) ou que les nôtres (peptide 1 pp, avec 27 résidus d'acides aminés: 70 unités). On peut en conclure que ce seront des peptides relativement courts qui présenteront probablement une activité strépegénique maximum.

En ce qui concerne les restes d'acides aminés trouvés, on constate toujours la présence de l'acide glutamique (13, 14, 23, 24).

Quant au procédé d'obtention de ces polypeptides actifs, le tableau suivant montre le schéma de fractionnement finalement adopté.

Schéma du fractionnement de l'hydrolysate de caséine



Pour établir les conditions permettant d'obtenir un hydrolysate partiel ayant une activité strépogénique maximum, nous avons fait varier systématiquement le rapport enzyme/substrat et la durée d'incubation. Les conditions adoptées ont été choisies en fonction des résultats de ces essais. L'activité est déterminée selon Sprince et Woolley (8), à l'aide du milieu de Landy et Dicken (25).

Pour le fractionnement, nous avons utilisé l'électrodialyse et l'ionophorèse sur papier à pH 2 et à haut potentiel (25-30 V/cm) à cause de leur rapidité et maniabilité. Nous réalisons ainsi un fractionnement nettement plus rapide que sur colonne. Avec le schéma indiqué, nous avons toujours obtenu des résultats parfaitement reproductibles.

PARTIE EXPERIMENTALE

Hydrolyse de la caséine par la trypsine cristallisée

La caséine employée est préparée selon Cherbuliez et Baudet (26). Elle est dévitaminée par extraction continue au méthanol durant 4 jours dans un Soxhlet, et ensuite séchée au vide. Une solution à 5% de cette caséine est préparée. Pour la détermination exacte de la concentration de cette solution, on mesure l'absorption U.V. d'une prise alcalinisée à pH 12. Les extinctions lues à 280, 294, 300 et 340 $m\mu$ (caractéristiques de la Tyrosine) permettent de connaître la concentration de la caséine sur la base d'une teneur en tyrosine de 6,5%.

La trypsine est une trypsine cristallisée "Armour", titrant 2000 unités Armour par milligramme. Le rapport enzyme/caséine en poids est de 1/133. L'incubation est faite durant 24 h à 38°, et le pH est maintenu à 7,8. L'incubation terminée, on chauffe à ébullition pendant 5 minutes, on refroidit et on centrifuge. On traite la solution par son volume d'acide trichloracétique à 20% et, après 20 minutes de repos, on centrifuge à 3000/minute. On traite ensuite la solution par son demi-volume d'acide trichloracétique à 60%. Après 20 minutes on centrifuge à 3000 tours/minute. On élimine ensuite l'acide trichloracétique de l'hydrolysate par 4 extractions successives par le même volume d'éther, sous agitation avec un appareil Vibromischer, durant 1 h. On concentre la solution aqueuse (avec un pH final de 3,8-4) au "Craig", puis on lyophilise.

Obtention de la fraction neutre par électrodialyse

de l'hydrolysats trypsique

Pour la séparation de l'hydrolysats trypsique en 3 fractions (neutre, acide et basique) on utilise l'appareil de Theorell et Akeson (27), dans la modification de Synge (28) adoptée par Sanger et Tuppy (29). On applique initialement 60 V et 200 mA. Au bout de 3 h 30 l'intensité du courant baisse peu à peu jusqu'à 100 mA et se stabilise. On concentre la fraction neutre au "Craig", et on la lyophilise.

Séparation de la fraction neutre par ionophorèse sur papier

La fraction neutre est séparée par 2 ionophorèses sur papier à pH 2,1 (tampon: acide acétique glacial 240 ml, acide formique 98% 184 ml, eau 7576 ml). On se sert du dispositif proposé par Michl (30), adopté par Sanger (31) et modifié par Baudet. Selon Baudet (non publié) on introduit les électrodes dans une enveloppe de cellophane remplie de tampon, ce qui empêche les produits de destruction se formant à partir du tampon durant l'ionophorèse, de contaminer le reste du tampon placé dans la cuve. On renouvelle le tampon dans les sacs de cellophane après chaque ionophorèse. Cette enveloppe de cellophane est placée dans un tube de verre, lui-même rempli de tampon. On augmente ainsi la surface utilisable de l'électrode. En plus on supprime le danger d'accumulation de peroxydes (?; inflammation spontanée).

La première ionophorèse à pH 2,1 s'effectue sur des bandes de papier whatman 3 de 12,5 cm de largeur et de 58 cm de longueur, que l'on charge comme suit: 25 mg de la fraction neutre sont dissous dans 0,5 ml de tampon. La solution est transvasée dans une auge à angle aigu en polyéthylène, de 15 cm de longueur. Le papier est plié le long de la ligne de départ se trouvant à 10 cm du bord supérieur (cathodique), et celle-ci est trempée dans l'auge. Ainsi on obtient une bande linéaire de la substance, dont la concentration est égale en tous points. Puis au moyen d'une pipette on dépose à 1-2 cm de chaque côté de cette bande, une trainée de la solution tampon et on attend que ces 2 trainées aient rejoint la ligne de départ par diffusion. On humecte alors le restant de la feuille de papier avec le tampon. On place le papier dans l'appareil, et on enclenche le courant. On travaille à 1700 V et 50 mA par feuille pendant 4 h. Le courant arrêté, on sort la feuille, on coupe en longueur sur l'un des bords une bande

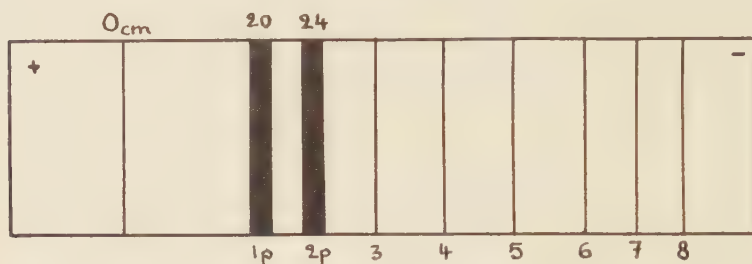
de 1,5 cm de large, que l'on sèche à 90°, et on la révèle par aspersion à la ninhydrine (ninhydrine 1 g, acide acétique glacial 25 ml, eau 25 ml, butanol secondaire 222 ml). Après révélation on obtient 8 bandes, dont on a seulement étudié les 2 premières (1 p et 2 p). Le restant de feuille est coupé en bandes transversales contenant chacune une substance suivant l'image obtenue. On travaille sans interruption, car il faut que le papier reste constamment humide, sinon les pertes à l'élution deviennent très importantes. L'élueur est un dispositif en bois, pouvant être tourné de 90°, et sur lequel sont fixés des porte-objets de microscopie. A la hauteur de ces lames, une auge en polyéthylène est fixée au dispositif; elle est remplie d'eau qui sert à alimenter les papiers-supports coupés en pointe et placés chacun entre 2 lames de verre. Sur les papiers-supports sont placées les bandes coupées contenant les substances à éluer. Les lames étant horizontales, on élue par capillarité ces substances durant 3-4 h et on renforce l'élution en plaçant un corps de chauffe, introduit dans un tube de verre, sous les pointes. L'air chaud est de 40° environ. Ainsi toute la substance se concentre à la pointe. Après 3-4 h on tourne le dispositif avec les lames de verre de 90°, les pointes des papiers en bas. La solution aspirée par capillarité est recueillie dans de petits godets. Les solutions sont immédiatement lyophilisées, pour empêcher toute destruction ou désactivation possible des substances. Puis on dose l'azote total du matériel élué, selon Baudet et Cherbuliez (32), et on détermine l'activité strépogénique de chaque fraction.

Deuxième ionophorèse: Purification des fractions 1 p et 2 p par ionophorèse prolongée à pH 2 à haut potentiel.

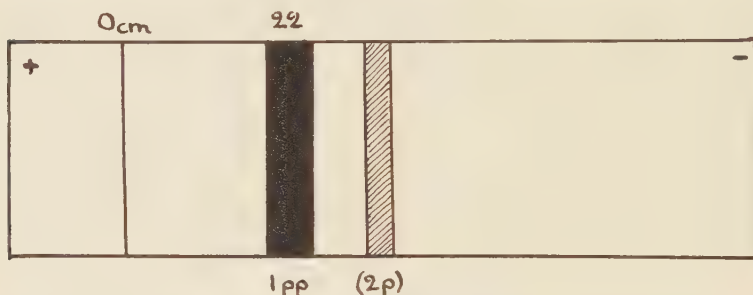
Après lyophilisation et dosage de l'azote total (32) des fractions 1 p et 2 p, nous avons réuni les fractions de 8 opérations (8-10 mg resp. de 1 p et de 2 p). Ces fractions sont soumises à une ionophorèse à pH 2, à haut potentiel, sur du papier Whatman 3 lavé. Lavage du papier: le papier Whatman 3 est lavé, par capillarité à flux descendant, par l'acide formique 2 N, pendant 3 jours, puis rincé à l'eau distillée également par capillarité, jusqu'à disparition de l'odeur de l'acide formique (33). Ensuite on sèche le papier à 40°. On dépose environ 10 mg resp. de 1 p et de 2 p par feuille (largeur 15 cm, longueur 58 cm) selon la technique indiquée. On soumet chaque feuille durant 5 h 30 à l'ionophorèse sous 1700 V, l'intensité du courant variant entre 40-50 mA. Pour l'élution selon le procédé décrit plus haut, on utilise du papier Whatman 3 lavé, afin d'augmenter les rendements si possi-

ble. Les 3 figures suivantes montrent les images des électrophorogrammes de la fraction neutre totale de 1 p et de 2 p.

Séparation de la fraction neutre totale par ionophorèse à pH 2,
à 1700 V (50 mA), 4 h

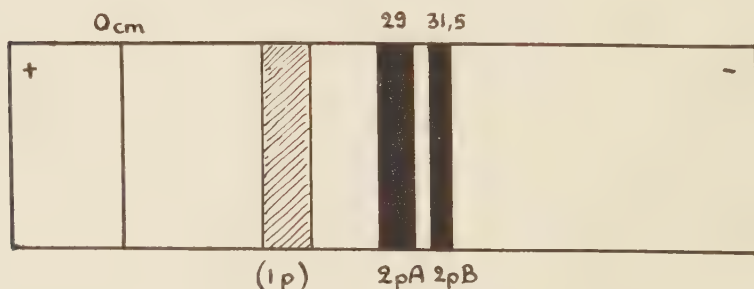


Purification du peptide 1 p par ionophorèse à pH 2, à 1700 V
(40-50 mA) 5 h 30



Parfois le peptide 1 p est contaminé par le peptide 2 p

Purification du peptide 2 p par ionophorèse à pH 2, à 1700 V
(40-50 mA), 5 h 30



Parfois le peptide 2 p est contaminé par le peptide 1 p

Après l'élué du matériel selon la technique usuelle, on dose l'azote total et on détermine l'activité stéréogénique des peptides 1 pp, 2 pA et 2 pB.

Vérification de la pureté des produits actifs

1 pp, 2 pA et 2 pB

Ces substances semblent homogènes, puisque pour chacune d'entre elles on ne trouve qu'un seul acide aminé resp. N- et C-terminal, et que le dosage des acides aminés donne des rapports moléculaires entiers. Nous avons toujours observé une parfaite reproductibilité des résultats.

Tableau des rendements et des activités stéréogéniques,
observés aux différents stades du fractionne-
ment de la fraction neutre

Substance	% de l'hydrolysât partiel d'après la teneur en azote	activité stéréogé- nique en unités Woolley
Fraction neutre de départ	100	20-25
Peptide 1 p	1,75	40
1 pp	0,41	6-70
2 p	3.4	20
2 pA	0.28	20
2 pB	0,09	46-50

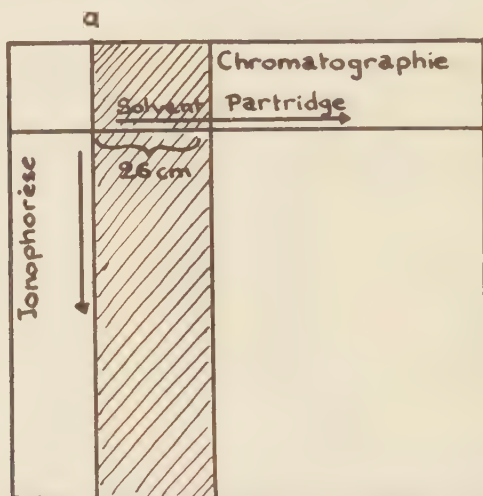
Les rendements très faibles en polypeptides purs sont dus avant tout à des adsorptions irréversibles sur le papier d'ionophorèse. Les polypeptides adsorbés ne réagissent plus à la ninhydrine, mais encore au réactif de Reindel. La fonction α -aminée est donc bloquée. On peut supposer qu'il y a fixation par blocage de la fonction α -aminée par les fonctions aldéhydiques de la cellulose.

Pour la détermination de la composition en acides aminés et de la structure séquentielle de ces 3 peptides, nous avons utilisé les méthodes suivantes:

- 1) Par hydrolyse à l'acide chlorhydrique 5,7 N, en tube capillaire scellé, à 105°, pendant 18 h (34), on obtient les acides aminés

libres, qui sont ensuite identifiés soit par chromatographie bidimensionnelle (35-37), soit par chromatographie et ionophorèse (38), soit par des réactions spécifiques (39-43).

- 2) Dosage des acides aminés (fournis par hydrolyse selon 1) à l'aide de leurs dérivés dinitrophénylés (15,44), ou par la ninhydrine (45) après chromatographie bidimensionnelle (37) ou chromatographie et ionophorèse selon Baudet (38): dans ce dernier cas les acides aminés sont d'abord soumis à une chromatographie descendante dans le solvant de Partridge (46), sur du papier SS 2043 b, matt, dans le sens de la fibre, durant 20 h; on sèche le papier à 40° durant 1 h, puis on découpe une bande de 26 cm de large à partir de la ligne a (v. Fig.)



On pulvérise sur cette bande du tampon pH 2,1. Puis on effectue une ionophorèse à pH 2,1, sous 1800 V, 30-40 mA, durant 2 h. Les taches des acides aminés révélés à la ninhydrine sont découpées ensemble avec 2 blancs, introduites dans des tubes à essai, et dosées par la ninhydrine selon Moore et Stein (45).

La proline est déterminée par la réaction de Chinard (47). On a adapté celle-ci à nos conditions, en déterminant la courbe d'étalon avec des concentrations diverses de proline, préalablement déposées sur le papier utilisé et révélées à la ninhydrine. La coloration est presque identique à celle obtenue en travaillant uniquement en solution.

Nous avons utilisé la méthode de chromatographie

plus ionophorèse, de préférence à celle de la chromatographie bidimensionnelle, puisque nous pouvons effectuer l'analyse dans un temps plus court (24 h au lieu de 48 h).

- 3) Ultramicrodosage de l'azote total par la ninhydrine, après dégradation sulfurique (32).
- 4) Dosage de l'azote amidé selon Archibald (48), modifié par Baudet. L'ammoniaque libéré par la soude caustique 1 N dans un tube en U, placé dans un bain-marie à 55°, est chassé par un vide léger et fixé directement sur l'acide sulfurique 0,5 N. Ainsi on peut doser l'ammoniaque libéré par la ninhydrine (45).
- 5) Détermination de l'acide aminé N-terminal selon Sanger (49-50). Nous avons quelque peu modifié la méthode: d'une part en prolongeant de 2 à 4 h la réaction avec le fluorodinitrobenzène en milieu alcalin, et d'autre part la sublimation du dinittrophénol avant l'hydrolyse chlorhydrique, au lieu de la faire après.
- 6) Détermination de l'acide aminé C-terminal par hydrolyse à la carboxypeptidase A (51,52), et par hydrazinolyse (53,54,55,56).
- 7) Hydrolyse à la pepsine du peptide 1 pp (57,58,59); pour la séparation des 11 peptides formés au cours de l'hydrolyse pepsique, nous avons utilisé l'ionophorèse à pH 2, à haut potentiel, dans des conditions précisées plus loin.

Analyse et structure séquentielle de 1 pp

Après hydrolyse classique chlorhydrique, on met en évidence, par chromatographie bidimensionnelle ou par chromatographie et ionophorèse, les acides aminés suivants: acide glutamique, acide aspartique, glycine, sérine, thréonine, alanine, valine, leucine (60), phénylalanine, tyrosine, proline (48), lysine.

Après hydrolyse alcaline (61), la chromatographie bidimensionnelle, ou une chromatographie suivie d'ionophorèse, montrent l'absence de tryptophane.

L'hydrolyse du peptide oxydé d'abord à l'acide performique (62-63) ne fournit pas d'acide cystéique; cette observation ainsi que la réaction négative du peptide avec le réactif de Folin (41) prouvent l'absence de cystine.

Le dosage des acides aminés et de l'ammoniaque donne le résultat suivant:

<u>Acides aminés et NH₃</u>	<u>Nombres de résidus</u>
NH ₃	11,0
Acide glutamique	7,9-8,1
Acide aspartique	3,9-4,1
Glycine	0,95-1,1
Sérine	1,95-2,2
Thréonine	1,95-2,1
Alanine	1-1,1
Valine	1,1-1,2
Leucine	2,8-3,1
Phénylalanine	2-2,1
Tyrosine	1,0
Proline	0,95-1,1
Lysine	1-1,1

Dans 11 des 12 restes aminés dicarboxyliques la deuxième fonction carboxyle est sous forme d'amide.

La phénylalanine est l'acide aminé N-terminal; la présence d'un seul acide aminé N-terminal est la preuve de la pureté du peptide, car l'absence de cystine exclut la présence de 2 chaînes identiques, liées par un pont -S-S. Le peptide est donc constitué d'une seule chaîne.

La méthode de l'hydrazinolyse selon Bradbury (56) donne la lysine comme acide aminé C-terminal.

La transformation du peptide à pH 6,5 et aux pH supérieurs, citée dans la partie générale, a été constatée de la façon suivante: on dissout le peptide dans le tampon pH 8 utilisé pour l'attaque à la carboxypeptidase (52), on laisse reposer durant 15 minutes, puis on évapore au vide. On soumet le résidu à une ionophorèse à pH 2, à haut potentiel, sous 1700 V, 40 mA durant 2 h. On constate l'apparition de 2 peptides acides, d'un peptide neutre et de 2 peptides basiques.

Lors de l'attaque limitée à la pepsine on travaille avec un rapport enzyme/substrat de 1/100 (58,59). La pepsine scinde le peptide en 11 peptides plus courts, que l'on sépare par ionophorèse à pH 2, à haut potentiel, sous 1500 V, 20 mA durant 2 h. On constate de très grandes pertes irréversibles sur le papier d'ionophorèse. Chaque peptide est hydrolysé avec l'acide chlorhydrique 5,7 N à 105°, durant 18 h. Dans une première prise les

acides aminés libérés par hydrolyse sont identifiés par chromatographie et ionophorèse. Une deuxième prise sert à la détermination de l'acide aminé N-terminal par dinitrophénylation, et à la détermination de l'acide aminé C-terminal libéré en premier par la carboxypeptidase A.

Image de l'hydrolysat pepsique du 1 pp

Distance
parcourue

0 cm		
3.5		1/1 Phe(Glu,Ser,Ala,Val,Leu,Gly,Lys) Glu ou Val
9		1/2 (Asp,Glu,Ser,Ala,Lys)Phe.Val
11.5		1/3 (Asp,Glu,Ser,Gly,Thr,Prol,Phe, Val,Leu,Ala,Lys)Phe
14		1/4 Glu(Asp,Glu,Ser,Ala,Prol)Leu
16,5		1/5 Leu(Asp,Glu,Prol,Ser,Ala,Gly, Leu)Leu
21		1/6 (Asp,Glu,Leu,Ala)Glu.Val
25		1/7 Gly(Asp,Glu,Ser,Ala,Gly,Lys)
28		1/8 (Asp,Glu,Ser,Ala,Gly,Lys)Lys
30		1/9 non déterminé
31,5		1/10 (Asp,Glu,Leu,Ala,Gly,Lys)Ser
36,5		1/11 (Glu,Ser,Gly,Lys)

Analyse et structure séquentielle de 2 pA

Comme les méthodes d'analyse sont identiques à celles décrites précédemment, nous nous contenterons de donner les résultats.

Le dosage des acides aminés et de l'ammoniaque donne:

<u>Acides aminés et NH₃</u>	<u>Nombres de résidus</u>
NH ₃	3,0
Acide glutamique	8-8,2
Acide aspartique	3-4
Glycine	0,9-1,15
Sérine	0,95-1,1
Thréonine	1,85-2,1
Alanine	1,0
Valine	1,9-2,2
Leucine	2,9-3,4
Phénylalanine	1-1,1
Tyrosine	1
Proline	1,85-2,15
Arginine	0,95-1
Lysine	2,0
Fraction basique } *	

* La fraction basique donne, après hydrolyse, les résidus suivants d'acides aminés (qualitativement): acide glutamique, alanine, glycine, lysine ou fraction basique non attaquée.

Dans 3 des 12 restes aminés dicarboxyliques la deuxième fonction carboxyle est sous forme d'amide.

Le tryptophane et la cystine sont absents.

La fraction basique est en fin N-terminale de la chaîne peptidique (v. partie générale).

L'attaque par la carboxypeptidase A, avec un rapport enzyme/substrat de 1/14, libre, au bout de 3 minutes, la valine comme acide aminé C-terminal. Le tableau suivant montre la libération des acides aminés par l'hydrolyse subséquente par ce même enzyme, en fonction du temps:

Après 3 minutes :Phe.Val
 6 minutes :Ala.Tyr.Phe.Val
 9 minutes :Gly.Ser.Ala.Tyr.Phe.Val

Les acides aminés sont classés par ordre croissant de l'intensité des taches.

La séquence en fin C-terminale de la chaîne peptidique est donc la suivante:Gly.Ser.Ala.Tyr.Phe.Val

Analyse de 2 pB

Ce peptide a été peu étudié. Le dosage des acides aminés et de l'ammoniaque donne le résultat suivant:

<u>Acides aminés et NH₃</u>	<u>Nombre de résidus</u>
NH ₃	3,0
Acide glutamique	4,1-4,95
Acide aspartique	1-2,1
Glycine	0,90-1
Sérine	1,90-2,1
Alanine	1,80-2,1
Thréonine	0,85-1,15
Valine	0,95-1,25
Leucine	2,95-4,1
Phénylalanine	1-2,1
Tyrosine	1,0
Proline	1,95-2,1
Lysine	2,0
Fraction basique }	

Dans 3 des 5 à 7 restes aminés dicarboxyliques, la deuxième fonction carboxyle est sous forme d'amide.

Le tryptophane et la cystine sont absents.-

On retrouve en fin aminée de la chaîne peptidique la même fraction basique, très difficile à hydrolyser, ci-dessus citée.

CONCLUSION

Notre ambition avait été d'établir la structure de 3 strépogénines neutres, afin de mieux connaître la nature de l'activité biologique des strépogénines, en comparant ces structures, avec celles des strépogénines basiques, établies par Cherbuliez, Baudet et Rössler. Cependant cette tâche devenait difficilement réalisable, dès le moment où nous nous rendîmes compte du poids moléculaire relativement élevé de ces peptides et du fait que ceux-ci comptaient respectivement 27, au moins 29 et au moins 24 acides aminés. Il doit être probable que leur activité biologique se localise dans une partie de leur chaîne peptidique. On pouvait penser alors qu'une simplification d'un de ces peptides (1 pp) aurait pu aboutir à un fragment doué d'une plus grande activité biologique, semblable à celle des peptides basiques de Rössler, ou même de ceux de Woolley. Malheureusement il s'est avéré impossible d'obtenir un tel fragment, puisque d'une part le peptide 1 pp se scinde déjà à pH 6,5 et aux pH supérieurs, en 2 peptides acides, un peptide neutre et 2 peptides basiques, et que d'autre part l'hydrolyse pepsique à pH 2 libère 11 peptides, sans que nous ayons pu dans les 2 cas, obtenir suffisamment de matériel, les rendements d'isolement étant trop faibles.

Nous montrons dans ce travail que l'on peut isoler d'un hydrolysats tryptique de caséine 3 peptides neutres de poids moléculaire relativement élevé. Ils sont caractérisés par une activité strépogénique facilement altérable, qui est le corollaire d'une altérabilité chimique bien mise en évidence. Leur particularité la plus frappante est leur teneur très élevée en résidus d'acides aminés dicarboxyliques. En effet le peptide 1 pp compte 8 restes glutamiques et 4 restes aspartiques sur l'ensemble desquels 11 sont sous forme d'amide. Le peptide 2 pA compte au moins 8 restes glutamiques et 3-4 restes aspartiques, soit 11-12 restes

d'acides dicarboxyliques, dont 3 sous forme d'amide, sur un total d'au moins 29 acides aminés. Les peptides 2 pA et 2 pB sont en outre caractérisés par la présence, en fin aminée de la chaîne peptidique, d'un résidu complexe, qui se comporte comme une combinaison peu habituelle de restes d'acides aminés, et très résistante à l'hydrolyse acide. Nous présentons des arguments tendant à faire admettre la présence, dans ce groupement, de fonctions amides secondaires du type $R-CO-N-CO-R_1$.



BIBLIOGRAPHIE

- (1) D.W. Woolley. J. Exptl. Med 73, 487 (1941)
- (2) N. Grossowicz. Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med. 49, 8 (1942)
- (3) H. Sprince, D.W. Woolley. J. Exptl. med. 80, 213 (1944)
- (4) M.A. Pollack, M. Lindner. J. Biol. Chem. 147, 183 (1943)
- (5) L.D. Wright, H.R. Skeggs. J. Bact. 48, 117 (1944)
- (6) L.D. Wright, H.R. Skeggs. J. Bact. 48, 117 (1944)
- (7) H. Sprince, D.W. Woolley. J. Exptl. Med. 80, 213 (1944)
- (8) H. Sprince, D.W. Woolley. J. Am. Chem. Soc. 67, 1734 (1945)
- (9) D.W. Woolley, R.B. Merrifield. J. Am. Chem. Soc. 76, 316 (1954)
- (10) D.W. Woolley, R.B. Merrifield, C. Ressler, V. du Vigneaud.
Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med. 89, 669 (1955)
- (11) R.B. Merrifield, D.W. Woolley. J. Am. Chem. Soc. 78, 358 (1956)
- (12) G.L. Tritzsch, D.W. Woolley. J. Am. Chem. Soc. 80, 1491 (1958)
- (13) E. Cherbuliez, P. Baudet, R. Rössler, non publié
- (14) R. Rössler. Thèse no 1277 Université de Genève, Faculté des
Sciences
- (15) G. Koch, W. Weidel, Hoppe-Seyler's Ztschr. Physiol. Chem. 303,
213 (1956)
- (16) A.G.L. Mills. Nature, 165, 403 (1950)
- (17) A.L. Lévy, Chung, Anal. Chem. 25, 396 (1953)
- (18) E. Work. Bioch. Biophys. Acta, 5, 204 (1950)
- (19) E. Gendre, E. Lederer. Bioch. Biophys. Acta, 8, 49 (1952)

- (20) R. Consden, A.H. Gordon, A.J.P. Martin. *Bioch. J.* 41, 590,
- (21) F. Reindel, W. Hoppe. *Chem. Ber.* 1103 (1954) (1947)
- (22) J. Edsall, A. Otvos, O. Rich. *J. Am. Chem. Soc.* 72, 474 (1950)
- (23) D.W. Woolley. *J. Biol. Chem.* 172, 71 (1948)
- (24) D.W. Woolley. *J. Biol. Chem.* 166, 783 (1946)
- (25) M. Landy, D.M. Dicken. *J. Lab. Clin. Med.* 27, 1086 (1942)
- (26) E. Cherbuliez, P. Baudet. *Helv. Chim. Acta*, XXXIII, 57 (1950)
- (27) H. Theorell, A. Akeson. *Ark. Kemi Min Geol.* 16A, no 8
- (28) R.L.M. Synge. *Bioch. J.* 49, 642 (1951)
- (29) F. Sanger, H. Tuppy. *Bioch. J.* 49, 4 (1951)
- (30) H. Michl. *Mh. Chem.* 82, 489 (1951)
- (31) A.P. Ryle, F. Sanger, L.F. Smith, R. Kitai. *Bioch. J.* 60, 4 (1955)
- (32) P. Baudet, E. Cherbuliez. *Helv. Chim. Acta* XL, 6 (1957)
- (33) D.F. Elliot, W.S. Peart. *Bioch. J.* 65, 2 (1957)
- (34) F. Sanger, H. Tuppy. *Bioch. J.* 49, 4 (1951)
- (35) L.B. Rockland, E. Underwood. *Anal. Chem.* 26, 10 (1954)
- (36) F. Sanger, H. Tuppy. *Bioch. J.*, 49, 4 (1951)
- (37) A.L. Lévy, Chung. *Anal. Chem.* 25, 396 (1953)
- (38) P. Baudet, E. Cherbuliez, non publié
- (39) R. Acher, A. Crocker. *Bioch. Biophys. Acta* 9, 704 (1952)
- (40) L.E. Thomas. *Arch. Biochem.* 5, 175 (1945)
J.P. Zalta, V. Khouvine. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 35, 697 (1953)
- (41) O. Folin, A.D. Marenzi. *J. Biol. Chem.* 83, 103 (1929)
M. Jutisz, *Techniques de laboratoire*, 662, Paris (1954)
- (42) R. Acher, C. Fromageot, M. Jutisz. *Bioch. Biophys. Acta*, 5, 81 (1950)
- (43) W. Grassmann, K.V. Armin. *Liebig's Ann. Chem.* 509, 288 (1934)
- (44) A.L. Lévy. *Nature*, 174, 127 (1954)
- (45) S. Moore, W. Stein. *J. Biol. Chem.* 211, 907 (1954)

- (46) S.M. Partridge. Bioch. J. 42, 238 (1948)
- (47) F.P. Chinard. J. Biol. Chem. 199, 91 (1952)
- (48) L. Archibald. J. Biol. Chem. 141, 151 (1952)
- (49) F. Sanger. Bioch. J. 39, 507 (1943)
- (50) F. Sanger, O. Thompson. Bioch. J. 53, 3 (1953)
- (51) J.L. Geschwind, Ch.H. Li, L. Barnafi. J. Am. Chem. Soc. 79, 620 (1957)
- (52) D.F. Elliot, W.S. Peart. Bioch. J. 65, 2 (1957)
- (53) S. Akabori, K. Ohno, K. Narika. Bull. Soc. Chim. Japan, 25, 214 (1952)
- (54) K. Schögl, F. Wenely, E. Wawersich. Mh. Chem., 85, 4 (1954)
- (55) N. Ching, H. Fraenkel-Conrat. J. Am. Chem. Soc. 77, 5882 (1955)
- (56) J.H. Bradbury. Nature, 178, 912 (1956)
- (57) R.R. Redfield, C.B. Anfinsen. J. Biol. Chem., 221, 1 (1956)
- (58) F. Sanger, H. Tuppy. Bioch. J. 49, 481 (1951)
- (59) F. Sanger, O. Thompson. Bioch. J. 53, 366 (1953)
- (60) E. Work. Bioch. Biophys. Acta, 3, 400 (1949)
- S. Linitzky, G. Laurent. Bull. Soc. Chim. Biol., 37, 1177 (1955)
- (61) A.L. Lévy, D. Chung. Anal. Chem., 25, 396 (1953)
- (62) F. Sanger. Bioch. J., 44, 126 (1949)
- (63) F. Sanger, A.P. Ryle, L.F. Smith, R. Kitai. Bioch. J., 60, 541 (1955)

